

Die quantitative Bestimmung von β -Indolylessigsäure
mittels Papierchromatographie und
Papierelektrophorese

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt/M.
D 30

vorgelegt von

Ruth Müller
aus Eberbach/Neckar

1953

Referent: Prof. Dr. F. Laibach
Korreferent: Prof. Dr. C. Montfort
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dezember 1952



Die unter dem umstehenden Titel zusammengefaßte und in „Beiträge zur Biologie der Pflanzen“, Band 30, S. 1 (1953), veröffentlichte Arbeit wurde in der Zeit von November 1950 bis Juni 1952 am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Institut für Chemie, Heidelberg, durchgeführt. Sie wurde auf Anregung von Herrn Dozent Dr. Franz Moewus begonnen und unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. F. Laibach und Herrn Professor Dr. D. Jerchel fortgesetzt.

(Aus dem Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg,
Institut für Chemie.)

Zur quantitativen Bestimmung von Indolylessigsäure mittels Papierchromatographie und Papierelektrophorese.

Von RUTH MÜLLER

A. Einleitung

Seit den Untersuchungen von F. KÖGL und Mitarbeitern (1934) ist neben dem pflanzeneigenen Auxin a und b die β -Indolylessigsäure als Wuchsstoff bekannt. Ihr gab Kögl wegen ihrer gleichartigen Wirkung trotz der von Auxin a und b verschiedenen Konstitution den Namen „Heteroauxin“. Während in den Untersuchungen der letzten Jahre das Kögl'sche Auxin nicht mehr sicher nachgewiesen werden konnte, wurde die Indolylessigsäure in verschiedenen Pflanzen, z. B. Mais, Spinat, Hafer-Koleoptilen als zellstreckender Wirkstoff aufgefunden (AVERY, BERGER und SHALUCHA 1941, HAAGEN-SMIT, LEECH und BERGREN 1942, BERGER und AVERY 1944, HATCHER 1943, V. GUTTENBERG und LEHLE-JOERGES 1947, WILDMAN und BONNER 1948, MOEWUS 1949a, REINERT 1950). Als Wuchsstoff, der sich gegenüber der Indolylessigsäure durch seinen neutralen Charakter auszeichnet, wurde weiter der Indolyacetaldehyd beschrieben (LARSEN 1944, 1947, GORDON und SANCHEZ-NIEVA 1949a), seine wuchsstoffartige Wirkung im Avena-Test soll allerdings erst nach enzymatischer Umwandlung in Indolylessigsäure erfolgen (LARSEN 1949, 1951). Arbeiten von GORDON und SANCHEZ-NIEVA (1949b) machen es wahrscheinlich, daß der Indolyacetaldehyd als Zwischenprodukt bei der enzymatischen Bildung der Indolylessigsäure aus Tryptophan eine Rolle spielte. Da neuerdings Indolyacetonitril ebenfalls als pflanzeneigener Wuchsstoff nachgewiesen wurde (JONES, HENBEST, SMITH und BENTLEY 1952), kann bei der Wuchsstoffbestimmung in Pflanzenextrakten bereits mit fünf verschiedenen Stoffen gerechnet werden, die sich in ihrer Wirkung nur schwer unterscheiden lassen. Je nach der angewandten Ex-

traktionsmethode läßt sich außerdem der von verschiedenen Autoren aufgefundene „gebundene Wuchsstoff“ erfassen (SKOOG und THIMANN 1940, WILDMAN und BONNER 1947, MOEWUS 1948a, 1949a, b). Er soll in der Pflanze an Eiweiß gebunden in inaktiver Form vorliegen und erst durch die Wirkung von Fermenten in aktiven Wuchsstoff übergeführt werden. Ein weiterer inaktiver Wuchsstoff konnte von H. FUNKE und H. SÖDING (1947, 1948) in Haferkeimlingen und Kartoffelknollen nachgewiesen werden.

Neben der Wirkung dieser Wuchsstoffe lassen verschiedene biologische Tests auch die Wirkung von Hemmstoffen erkennen. Wenn auch einzelne Substanzen wie Cumarin, Parasorbinsäure, Skopoletin, Protoanemonin heute als Hemmstoffe angesprochen werden und Arbeiten von H. LINSER und F. MOEWUS über eine wuchsstoffantagonistische Wirkung solcher Stoffe berichten (LINSER 1940, WIELAND, FISCHER u. MOEWUS 1949, MOEWUS 1949b), so herrscht doch über die chemische Natur und den Wirkungsmechanismus der in Pflanzen aufgefundenen Hemmstoffe noch Unklarheit. Bei verschiedenen Wuchsstofftesten können die Ergebnisse außerdem durch in Pflanzen vorkommende einfache Säuren oder bei der Extraktion freigelegte Verbindungen beeinflusst werden. Infolge dieser vielfältigen Beeinflussbarkeit der Wuchsstoff-Testverfahren sind an verschiedenen Testobjekten vorgenommene quantitative Bestimmungen nur schwer miteinander zu vergleichen.

Um den Wuchsstoffgehalt eines Pflanzenextraktes zu bestimmen und die Wirkung eines bestimmten Stoffes zu erfassen, ist es daher notwendig, den Wuchsstoff von anderen wirksamen Begleitsubstanzen zu trennen. Dies war bisher nur sehr schwer möglich. Man bediente sich in den meisten Untersuchungen indirekter Bestimmungsmethoden. So wurde z. B. Indolylessigsäure von Auxin a und b durch ihre Säureempfindlichkeit und Laugenfestigkeit unterschieden. Neuerdings machte man von der Tatsache Gebrauch, daß ein in Erbsen enthaltenes Ferment die Indolylessigsäure zerstört (TANG und BONNER 1947). Aus der Differenz der Wuchsstoffwirkung vor und nach dieser Behandlung wurde dann auf den Gehalt von Indolylessigsäure geschlossen. Eine solche quantitative Bestimmung ist aus den erwähnten Gründen mit großen Fehlern behaftet. H. LINSER weist schon darauf hin, daß „ein durch eine einfache Testung gefundener Wuchsstoff-Wert nicht einfach als Maßstab für den Wuchsstoffgehalt einer Pflanze betrachtet werden“ darf (LINSER 1951). Um quantitative Bestimmungen von Wuchs- und Hemm-

stoffen nach vorheriger Trennung vorzunehmen, führte er seine Versuche zur Chromatographie pflanzlicher Wuchsstoffe an der Aluminiumoxydsäule durch. Er konnte damit wohl qualitativ die Indolylessigsäure nachweisen, ob sie aber völlig von anderen wirk-samen Begleitsubstanzen getrennt war, ist noch nicht bewiesen. Ein anderer Weg zur Abtrennung von Wuchsstoffen wird in der Arbeit von R. W. HOLLEY, F. P. BOYLE, H. K. DURFEE und A. D. HOLLEY (1951) aufgezeigt. Hier wird der Versuch gemacht, die Indolylessigsäure nach Verteilung zwischen Wasser und Äther im Craig'schen Apparat zu bestimmen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war nun, auf der Grundlage einer möglichst einfachen Trennungsmethode eine Identifizierung und quantitative Bestimmung der Indolylessigsäure auszuarbeiten. Hierfür schien die von CONSDEN, GORDON und MARTIN (1944) eingeführte Papierchromatographie sehr geeignet, die sich in den letzten Jahren bei Untersuchungen vieler Stoffgemische bewährt hat. Diese Methode hat den Vorteil, daß bei einfacher Handhabung der gewünschte Trenneffekt zu erreichen ist. Außerdem gestattet sie das Arbeiten mit sehr kleinen Mengen. Auch die von TH. WIELAND und E. FISCHER (1948) ausgearbeitete Papierelektrophorese wurde in die Unter-suchungen einbezogen und in Verbindung mit der Papierchromato-graphie angewandt.

Nach einer kurzen Veröffentlichung der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse (Die Naturwissenschaften 38, 561 [1951]) erschienen weitere Arbeiten über die papierchromatographische und elektrophoretische Bestimmung der Indolylessigsäure: H. PACHECO, Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) 33, 1915—1918 (1951); D. V. DENFFER, M. BEHRENS und A. FISCHER, Naturwissenschaften 39, 258 (1952); L. C. LUCKWILL, Nature 169, 375 (1952); T. A. BENNET-CLARK, M. S. TAM-BIAH und N. P. KEFFORD, Nature 169, 452 (1952).

B. Methodischer Teil

1. Papierchromatographie der Indolylessigsäure

Die papierchromatographische Bestimmung der Indolylessig-säure und ihre Abtrennung aus Pflanzenextrakten wurde nach dem eindimensionalen absteigenden Verfahren auf Whatman-IV-Papier durchgeführt. Als Lösungsmittel eigneten sich basische Mischungen wie Propanol/Ammoniak/Wasser, Methyläthylketon/Pyridin/Wasser oder Butanol/Ammoniak/Wasser.

Auf einem Papierstreifen von 60 cm Länge und 8 cm Breite wurde entlang einer 6 cm langen und 7 cm vom oberen Rande entfernten Startlinie mittels einer Kapillarpipette die wäßrige Lösung der Indolylessigsäure möglichst gleichmäßig aufgetragen. Als Chromatographiergefäß diente ein hoher verschließbarer Glaskasten, in dessen oberem Teil sich eine Rinne aus V2A-Stahl befand, die mit dem zu verwendenden Lösungsmittelgemisch gefüllt war (vgl. CRAMER 1952). Der Boden des Glastroges war 1—2 cm hoch von dem gleichen Lösungsmittelgemisch bedeckt, um eine gleichmäßige Sättigung der Gefäßatmosphäre zu erreichen. Der nach dem Auftragen getrocknete Papierstreifen wurde oberhalb der Startlinie über einem waagerechten Glasstab so aufgehängt, daß sein Ende in die Lösungsmittelrinne eintauchte. Die Chromatographie war beendet, wenn das aus der Rinne angesaugte Lösungsmittelgemisch mit seiner Front etwa 10 cm vor dem unteren Rande des Streifens angelangt war. Die Laufzeit hing von der Art des Lösungsmittels ab. Sie betrug 4—8 Stunden. Beim Herausnehmen mußte die Lösungsmittelfront, deren Entfernung von der Startlinie für die Bestimmung der R_f -Werte nötig ist, gekennzeichnet werden. Das Chromatogramm wurde dann senkrecht mit dem Startende nach unten bei Zimmertemperatur zum Trocknen aufgehängt.

Zur Auswertung konnte auf dem getrockneten Chromatogramm die Zone der Indolylessigsäure festgelegt werden:

1. durch biologische Tests (Kressewurzel-Test, Erbsen-Test),
2. mittels der Zimtaldehyd-HCl-Farbreaktion,
3. mit Hilfe der Betrachtung und photographischen Auswertung mit Licht der Wellenlängen 270—290 m μ (Photoprint-Verfahren)¹.

Der R_f -Wert der Indolylessigsäure ergab sich dann als Quotient aus der Entfernung Startlinie—Indolylessigsäurezone und der Entfernung Startlinie—Lösungsmittelfront.

Zur quantitativen Auswertung wurde die Zone der Indolylessigsäure herausgeschnitten und nach der von C. E. DENT, W. STEPKA und F. C. STEWART (1947) angegebenen Methode mit Wasser eluiert.

2. Papierelektrophorese

Zur Papierelektrophorese der Indolylessigsäure kam das von TH. WIELAND und E. FISCHER (1948) angegebene Verfahren zur An-

¹ Eine ausführliche Besprechung dieser Nachweisverfahren erfolgt bei der Behandlung der Versuchsergebnisse.

wendung. In der Mitte eines 30 cm langen und 8 cm breiten Streifens von Whatman-IV-Papier wurde ähnlich wie bei der Papierchromatographie längs einer 6 cm langen Startlinie die Substanz aufgetragen. Die Elektrophorese-Einrichtung bestand aus einer rahmenartigen Kammer aus Glas und Kunststoff, zwei Petrischalen und zwei Platinelektroden. In die Kammer wurde der mit einer Pufferlösung des zu wählenden pH-Wertes besprühte Papierstreifen horizontal so eingelegt, daß die auf beiden Seiten herausragenden Enden in die Petrischalen eintauchten. Diese Schalen waren mit Pufferlösung gefüllt und über die Platinelektroden mit einer Gleichstromquelle von 220 V verbunden. Bei Schließen des Stromkreises wanderte nun die aufgetragene Indolylessigsäure nach der Anode, die sie begleitenden Substanzen je nach ihrer elektrischen Ladung mehr oder weniger weit zur Anode oder Kathode. Auf diesem Wege konnte eine Auftrennung von Gemischen erreicht werden. Der Wanderungssinn und die Wanderungsgeschwindigkeit der Begleitstoffe hängen von der Wahl des pH-Wertes der Pufferlösung ab. Der jeweils günstigste pH-Wert mußte in einer Reihe von Versuchen ermittelt werden. Zum Nachweis der Indolylessigsäure auf dem Elektrophoresestreifen dienten die bei der Papierchromatographie angegebenen Verfahren.

3. Kressewurzel-Test

Die Ausführung des Kressewurzel-Testes erfolgte nach der von MOEWUS (1948b, 1949c) beschriebenen Weise. Als Saatgut wurde *Lepidium sativum* „Ernte 1950“ der Firma Karl Hild, Marbach/Neckar, verwendet. Die Keimfähigkeit dieser Samen betrug im Keimversuch mit 1000 Samen 98 % und entsprach somit den von Moewus geforderten Bedingungen. Die Standardkurve der Indolylessigsäure konnte im Hemmbereich (10^{-3} bis 10^{-9} g/ccm) in verschiedenen Versuchen in guter Übereinstimmung mit derjenigen von Moewus erhalten werden. Dagegen ließen sich die Zuwachswerte im Förderungsbereich nicht reproduzieren, sondern lagen innerhalb der Schwankungsbreite der Wasserkontrolle. Zahlreiche Versuche, die mit den Verdünnungen 10^{-10} und 10^{-11} g/ccm und Wasserkontrollen an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, bestätigten dieses Ergebnis (Tabelle 1).

Tabelle 1

Versuche zur Ermittlung der Wachstumsförderung von Kressewurzeln durch Indolylessigsäure (IES). Die aufgeführten Einzelwerte sind Zuwachsmittelwerte von je 10 Wurzeln pro Schale

Versuch vom 11. 4. 1951			Versuch vom 16. 4. 1951			Versuch vom 19. 4. 1951		
Wasser- kontr.	IES 10 ⁻¹¹ g/ccm		Wasser- kontr.	IES 10 ⁻¹¹ g/ccm	IES 10 ⁻¹⁰ g/ccm	Wasser- kontr.	IES 10 ⁻¹¹ g/ccm	IES 10 ⁻¹⁰ g/ccm
	17.5	18.6	18.5	19.5	18.5	17.9	18.4	18.4
	18.2	18.3	18.1	19.6	18.8	17.5	18.2	17.9
	18.3	18.0	17.8	18.8	18.2	18.2	18.6	18.7
	18.4	18.3	18.8	17.7	18.0	18.2	18.4	18.5
	18.6	18.5						
Mittelwert:	18.3	18.5	18.3	18.9	18.3	17.9	18.4	18.3
mm-Zuwachs/Std.	1.07	1.08	1.07	1.11	1.07	1.05	1.08	1.07
Förderung %		+1		+3.2	—		+2.9	+2.2
t:		0.48		1.738	0.174		1.76	1.72
P:		0.62		0.08	0.86		0.08	0.08

Die in Tabelle 1 aufgeführten Versuche wurden einer statistischen Prüfung unterzogen. Dabei ergab die Sicherung der Differenz (PÄTAU 1943) in allen Fällen $P > 0,05$. Dies bedeutet, daß die Differenzen der Zuwachsmittelwerte bei den Konzentrationen 10^{-10} und 10^{-11} g/ccm Indolylessigsäure gegenüber denen der Wasserkontrolle statistisch nicht zu sichern sind.

Als Ursache für dieses Versagen könnte angeführt werden, daß die Zuwachsmittelwerte der Wasserkontrollen bei dem hier verwendeten Saatgut höher lagen als bei dem von Moewus verwendeten Saatgut. Während der mittlere Zuwachs der von Moewus angeführten Wasserkontrollen (MOEWUS 1949c) nach 17 Stunden im Durchschnitt 0,99 mm/std. betrug, lag der mittlere Zuwachs von Saatgut „1950“ im gleichen Zeitraum und bei den gleichen äußeren konstanten Bedingungen bei 1,06 mm/std. Die Zuwachswerte der Wasserkontrolle waren also um 8 % höher. Man könnte daher bei der großen Heteroauxin-Empfindlichkeit der Wurzel vermuten, daß das Saatgut „1950“ selbst einen so hohen Wuchsstoffgehalt besitzt, daß die Wurzel auf eine zusätzliche Menge nicht mehr mit einer Förderung reagiert. Versuche mit verschiedenen Samengrößen des verwendeten Saatgutes, das in einer Sortiermaschine auf zwölf Größenklassen verteilt wurde, ergaben auch keine positiven Ergebnisse. Kürzere Versuchszeiten führten ebenfalls zu keinem Erfolg.

Da der Förderungsbereich des Kressewurzel-Testes für eine quantitative Bestimmung der Indolylessigsäure nicht verwendet

werden konnte, wurde versucht, hierfür den Hemmbereich heranzuziehen. Die Hemmkurve der Indolylessigsäure, die sich über die Konzentrationen 10^{-3} bis 10^{-8} mol/l erstreckt, hat, wie schon oben erwähnt, den Vorteil, daß sie jederzeit reproduziert werden kann und daß unter konstanten Bedingungen Versuche verschiedener Tage vergleichbar sind. Erstreckt sich die Hemmung über den ganzen Bereich von 10^{-3} bis 10^{-8} mol/l, so kann die Kurve wohl als spezifisch für Indolylessigsäure angesprochen werden. Bei Hemmstoffen wie Cumarin oder Parasorbinsäure und vielen in Pflanzen vorkommenden aliphatischen und aromatischen Säuren² wird die Hemmwirkung nur über 3—4 Zehnerpotenzen beobachtet. Andere bisher bekannte Wuchsstoffe, wie z. B. Indolylpropionsäure, Indolylbuttersäure, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, α -Naphthylessigsäure zeigen zwar eine ähnliche Hemmkurve im Kressewurztest, haben aber die gleiche Wirkung erst bei Konzentrationen, die 1—2 Zehnerpotenzen stärker sind (Abb. 1). Dadurch und durch die Tatsache,

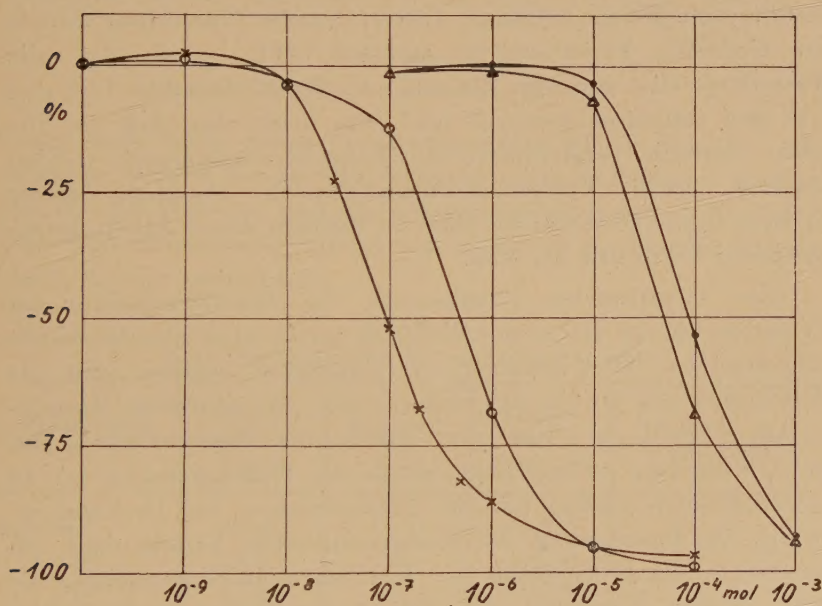


Abbildung 1

Wirkungskurven verschiedener Wuchs- und Hemmstoffe

x — x Indolylessigsäure

 Δ — Δ Indolylbuttersäureo — o α -Naphthylessigsäure

● — ● Cumarin

² F. MOEWUS, unveröffentlicht.

daß im Hemmbereich additive Wirkungen verschiedener Stoffe auftreten können, erfährt die Anwendbarkeit des Testverfahrens gewisse Einschränkungen. Für die quantitative Bestimmung der Indolylessigsäure ist diese Methode also nur brauchbar, wenn keine anderen wirksamen Substanzen anwesend sind. Dies soll durch die in der vorliegenden Arbeit entwickelte papierchromatographische Abtrennung der Indolylessigsäure erreicht werden.

Quantitative Auswertung

Da bei der Auswertung des Kressewurzeltestes (MOEWUS 1949c) die Wasserkontrolle als Bezugsgröße für die Zuwachswerte in wuchsstoff- oder hemmstoffhaltigen Lösungen dient und durch äußere Einflüsse hervorgerufene Wachstumsstörungen während der Versuchszeit anzeigt, mußte die Streuung der Zuwachsmittelwerte der Wasserkontrolle festgestellt werden. Dazu wurde an drei verschiedenen Tagen der Zuwachswert von je 100 Wurzeln in doppelt destilliertem Wasser bestimmt. Die statistische Auswertung mittels der einfachen Varianzanalyse (MOEWUS 1949c) ergab, daß alle Wasserkontrollen mit dem Zuwachs pro Stunde zwischen 1,02 und 1,11 mm statistisch homogen sind. Das heißt also, daß nur für solche Versuche vergleichbare Bedingungen angenommen werden konnten, deren Wasserkontrollzuwachswerte innerhalb dieser Grenzen lagen. Dies war bei allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen der Fall.

Zur quantitativen Bestimmung der Indolylessigsäure im Hemmbereich des Kressewurzel-Testes wurde eine Standardkurve aufgenommen. Die einzelnen Kurvenpunkte ergaben sich als Mittelwerte aus jeweils 60 Einzelwerten pro geprüfter Konzentration (Tabelle 2). Um eine unbekannte Konzentration von Indolylessigsäure zu ermitteln, wurde die Wirkungskurve der zu untersuchenden Lösung mit der Standardkurve zur Deckung gebracht. Die Bestimmung des Wuchsstoffgehaltes konnte dann am genauesten durch Vergleich der Konzentrationen geschehen, die eine 50%ige Hemmung der Kressewurzeln hervorrufen; hier zeigt die Kurve der Indolylessigsäure den steilsten und damit empfindlichsten Bereich (Abb. 2). Auch CLAUSS (1952) wies darauf hin, daß Wuchsstoffkonzentrationen, die einem bestimmten Zuwachswert der Kressewurzel entsprechen, an der Standardkurve nicht in jedem Bereich mit derselben Genauigkeit abgelesen werden können, da der Zuwachs der Wurzeln den Wuchsstoffkonzentra-

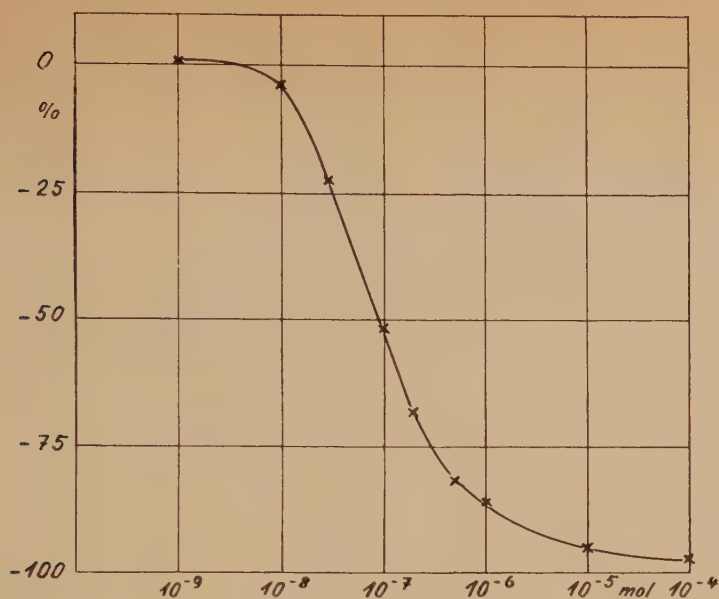


Abbildung 2
Standardkurve der Indolylessigsäure

tionen nicht linear proportional aufgetragen ist. In dem hier verwendeten Bereich beträgt der dreifache mittlere Fehler $\pm 3\text{--}4\%$ (bei 30—60 Wurzeln) und die Ablesegenauigkeit von $\pm 15\text{--}20\%$ zeigt Übereinstimmung mit der von H. CLAUSS aus Standardkurven von F. MOEWUS errechneten.

Tabelle 2
Werte zur Standardkurve der Indolylessigsäure

Konzentration molar	Zuwachs- mittelwert mm	Hemmung %	3-facher mittlerer Fehler mm	Sicherung der Differenzen
Aqua dest.	18.76		± 0.576	
10^{-4}	0.56	— 97	± 0.126	
10^{-5}	0.92	— 95.1	± 0.107	
10^{-6}	2.38	— 87.3	± 0.15	
5×10^{-7}	3.37	— 82	± 0.168	
2×10^{-7}	5.88	— 68.6	± 0.285	} $P = 0,0002$
10^{-7}	9.03	— 51.8	± 0.39	
3×10^{-8}	14.39	— 23.3	± 0.531	} $P = 0,0002$
10^{-8}	17.23	— 8	± 0.63	

4. Erbsen-Test

Der von J. VAN OVERBEEK und F. W. WENT (1937) eingeführte Erbsen-Test diente in der vorliegenden Arbeit zum qualitativen Nachweis der Indolylessigsäure. Es wurden Erbsen der Sorte „Alaska“ 3 Min. in konz. Schwefelsäure gereinigt, gut mit Wasser abgespült und dann in großen Glasschalen zu einer Vorauslese ausgesät. Nach 2 Tagen kamen alle Samen mit 3—5 cm langen Wurzeln zur Anzucht. Zu diesem Zweck wurden sie in offene Glasschalen auf eine 2—3 cm dicke Lage mit Wasser getränktem Zellstoff gelegt und 7 Tage bei 24° und 90% Luftfeuchtigkeit gehalten. Dann hatten die Erbsensprosse 3 Internodien. Zum Test konnten nur solche Sprosse verwendet werden, deren drittes Internodium etwa 5 cm lang war. Nach Entfernung der Spitze wurde am dritten Internodium ein 3 cm langes Stück abgeschnitten und mit dem von F. W. WENT vorgeschriebenen „Cutter“ gespalten. Die Spalthälften blieben anschließend 2 Std. in doppelt destilliertem Wasser und wurden dann in Petrischalen mit 8 ccm der zu prüfenden Lösung zusammengebracht. Beim Vorliegen einer Wuchsstofflösung war schon nach 5—6 Std. eine Wirkung zu beobachten; es krümmten sich die beiden Hälften des gespaltenen Erbsenepikotyls nach innen. Die Auswertung erfolgte nach 18—20 Std. Da die Krümmungen an den Spalthälften sehr schwer zu messen sind, wurden die Erbsensprosse zwischen zwei Glasplatten gelegt und durch Belichten mit einer UV-Lampe auf Ozalid-Papier³ photographisch abgebildet. Um die quantitative Wirkung einer Substanz im Erbsentest festzulegen, ist es notwendig, eine Verdünnungsreihe zu prüfen, im Falle der Indolylessigsäure von der Konzentration 10^{-4} bis 10^{-6} g/ccm. Es zeigte sich aber, daß die Beziehung zwischen dem Krümmungswinkel und der Konzentration des Wuchsstoffes wegen der großen Schwankungsbreite dieses Testverfahrens nicht sehr genau ist. Außerdem war nach der papierchromatographischen Trennung der untersuchten pflanzlichen Extrakte die Wuchsstoffkonzentration des Eluates meist zu gering, um eine Verdünnungsreihe herzustellen. Es mußte daher in der vorliegenden Arbeit von der quantitativen Auswertung des Erbsen-Testes abgesehen werden. Dagegen wurde er zur qualitativen Stütze der mit dem Kressewurzel-Test quantitativ erhaltenen Ergebnisse herangezogen. Dies schien wünschenswert, weil der Kressewurzel-Test nur im Hemm-

³ Kalle und Co., Wiesbaden-Biebrich.

bereich anzuwenden war und dabei die charakteristische Wirkung eines Wuchsstoffes, die Wachstumsförderung, nicht demonstriert werden konnte.

C. Experimenteller Teil

I. Modellversuche zur papierchromatographischen Bestimmung der Indolylessigsäure (JES)

1. Qualitativer Nachweis der Indolylessigsäure

Für den Nachweis der Indolylessigsäure auf dem Papierstreifen mußte eine möglichst selektive Farbreaktion verwendet werden. Am geeignetsten hierfür erwies sich die Reaktion mit Zimtaldehyd (WIELAND 1949), bei der Indolverbindungen in Gegenwart von HCl rote Färbungen ergeben.

Der nach der Chromatographie an der Luft getrocknete Streifen wurde mit einer 1%igen Lösung von Zimtaldehyd in Methanol besprüht. Nach Verdunsten des Methanols ließ sich bei Einbringen des Streifens in eine HCl-Atmosphäre die Indolylessigsäure als rote, nach einiger Zeit verblassende Farbzone erkennen. $0,5 \text{ } \gamma/\text{cm}^2$ konnten gerade noch nachgewiesen werden. Sollte die Zone eluiert werden, wurde am Chromatogramm ein schmaler Streifen abgeschnitten, die Indolylessigsäure hier nachgewiesen und die entsprechende Zone am übrigen Streifen ausgeschnitten.

Ein weiterer Nachweis, der ebenfalls direkt am Streifen vorgenommen werden kann, beruht auf der von R. MARKHAM und J. D. SMITH (1949) bei der Chromatographie der Nucleinsäuren als Photoprint-Verfahren angewandten Methode. Als Lichtquelle diente dabei ein Leiss-Doppelmonochromator. Das Chromatogramm wurde mit monochromatischem Licht der Wellenlänge $280 \text{ m}\mu$, die dem Absorptionsmaximum der Indolylessigsäure entspricht, durchstrahlt. Dabei bildete sich die Zone der Indolylessigsäure auf einem untergelegten Photopapier (Agfa LUN 1) als heller Fleck ab. Die Grenze der Nachweisbarkeit liegt hier bei $1 \text{ } \gamma/\text{cm}^2$.

Der Vorteil dieses Verfahrens beruht auf der Möglichkeit, die Elution mit dem gleichen Streifen vorzunehmen, auf dem vorher der Nachweis erfolgt war. Hierbei muß allerdings berücksichtigt werden, daß Indolylessigsäure durch längere UV-Bestrahlung zerstört wird.

Während der hier durchgeführten Untersuchungen konnte immer wieder festgestellt werden, daß Lösungen von Indolylessigsäure, die einen Tag lang am Licht stehen blieben, eine braunrote

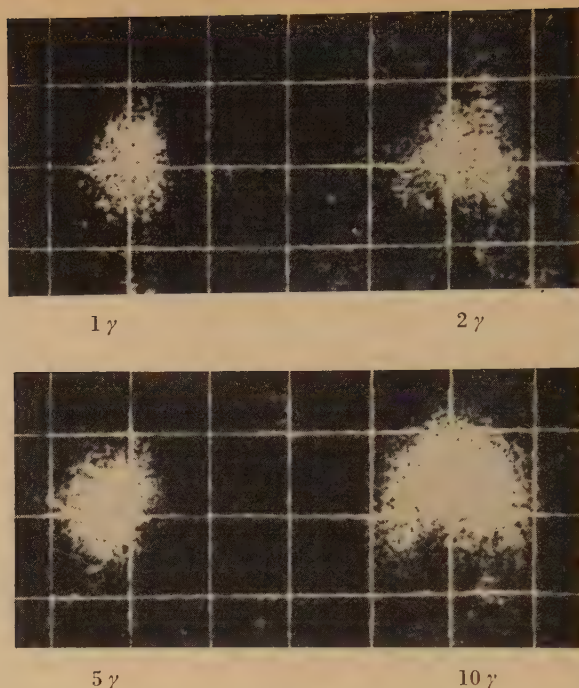
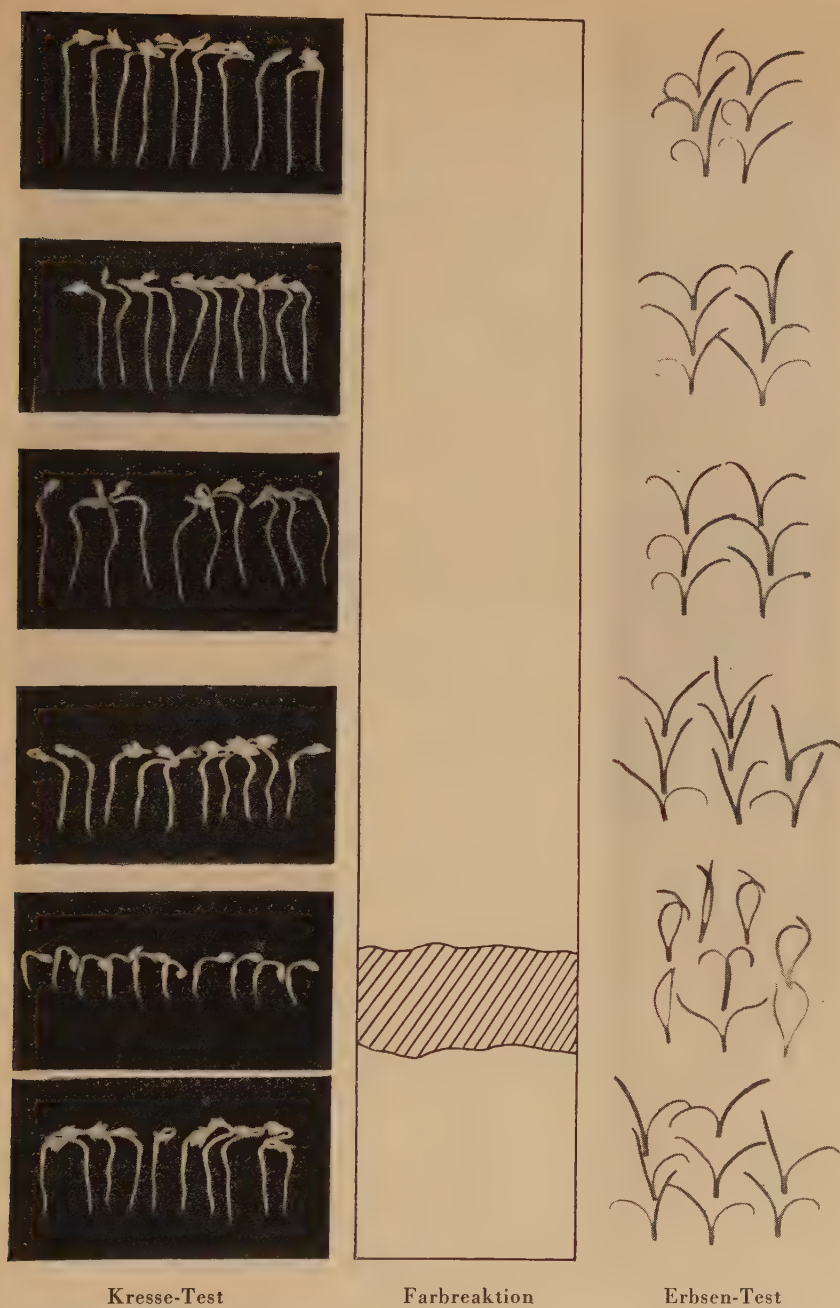


Abbildung 3
Photoprint-Verfahren

Farbe annahmen. Im Anschluß an diese Beobachtung versuchten JERCHEL und JACOBS (1953) das Oxydationsprodukt, das wahrscheinlich bei der Belichtung unter Sauerstoffzutritt entstand, chemisch zu identifizieren. Eine über 20 Std. andauernde Belichtung mit Sonnen- oder UV-Licht reichte aber nicht aus, auf Papier fein verteilte Indolylessigsäure völlig zu zerstören. Bei der Chromatographie war immer noch eine Substanz festzustellen, die mit dem R_f -Wert der Indolylessigsäure wanderte und die Farbreaktion mit Zimtaldehyd + HCl ergab. Daneben trat aber bei zunehmender Zerstörung auf dem Papier ein immer stärker werdender fluoreszierender Streifen direkt unterhalb der Indolylessigsäurezone auf. Die vorsichtige Oxydation mit H_2O_2 unter Verwendung von Vanadinpentoxyd als Katalysator führte zu einer außerordentlich starken Fluoreszenz; hierbei zeigte die Zimtaldehyd-Reaktion ein negatives Ergebnis. Da bei den Versuchen jeweils nur ein geringer Teil der Indolylessigsäure umgesetzt werden konnte, war eine Identifizierung der bei der Bestrahlung entstandenen Substanz bisher nicht möglich.



Kresse-Test

Farbreaktion

Erbsen-Test

Abbildung 4

Um die biologische Wirksamkeit der chromatographierten Indolylessigsäure zu prüfen und den Nachweis der Farbreaktion zu bestätigen, wurde eine orientierende qualitative Untersuchung des gesamten chromatographierten Streifens im Kresse-Test (Hemmwirkung) und im Erbsen-Test (Wuchsstoffwirkung) vorgenommen. Die Austestung erfolgte in der Weise, daß der Streifen in ~ 5 cm breite Zonen geschnitten wurde. Bei der Anwendung des Kresse-Testes wurden diese Streifen in Petrischalen mit 4 ccm Wasser getränkt und 5 mm lange Kressewurzeln darauf gelegt. Die Durchführung des Erbsen-Testes erfolgte entsprechend mit 8 ccm Wasser, in das die Erbsenspaltstücke eingetaucht waren. Abb. 4 zeigt, daß die Zone der mit der Farbreaktion nachgewiesenen Indolylessigsäure im Kresse-Test Hemmwirkung und im Erbsen-Test Einwärtskrümmung der Spalthälften, d. h. Wuchsstoffwirkung, hervorruft.

Die oben erwähnten vier Nachweismethoden geben also eindeutig die Lage der Indolylessigsäure auf dem chromatographierten Streifen an. Wenn auch die einzelnen Reaktionen nicht ganz spezifisch für Indolylessigsäure sind, so ist doch zu erwarten, daß bei Übereinstimmung aller Nachweise die vorliegende Substanz als Indolylessigsäure angesprochen werden kann.

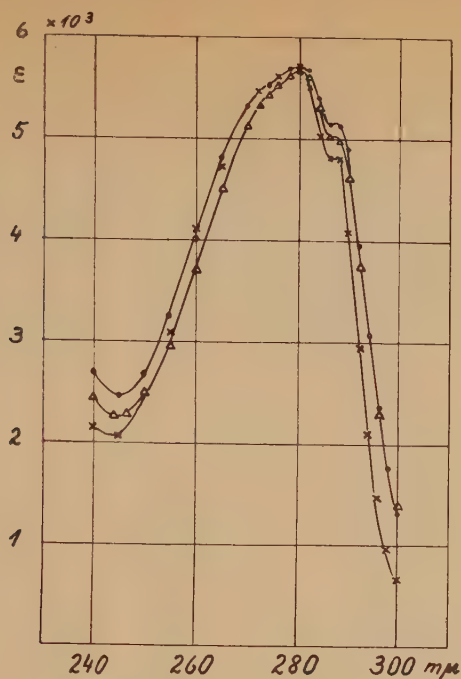
Eine weitere Bestätigung finden diese Bestimmungsmethoden durch die Aufnahme des UV-Absorptionsspektrums. Es wurde am chromatographierten Streifen die Zone, in der in der erwähnten Weise Indolylessigsäure nachgewiesen war, eluiert und im Beckman-Spektrophotometer das Absorptionsspektrum des Eluates gemessen. Dieses stimmt mit demjenigen der Indolylessigsäure überein. In beiden Fällen liegt das Maximum bei $280\text{ m}\mu$, das Minimum bei $245\text{ m}\mu$ (Abb. 5).

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Papierchromatographie zur Bestimmung der Indolylessigsäure ist, daß diese während der Chromatographie keine Veränderung chemischer Art erleidet. Wie die Wirksamkeit des Eluates in biologischen Testen und die Übereinstimmung der Absorptionsspektren zeigen, ist diese Forderung erfüllt.

2. Bestimmung der R_f -Werte der Indolylessigsäure in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

Die Bestimmung der R_f -Werte erfolgte auf dem im methodischen Teil angegebenen Wege (S. 4).

Die zur Bestimmung der R_f -Werte verwendeten Lösungsmittel wurden unmittelbar vor der Chromatographie durch Destillation



- x — x IES vor der Chromatographie
 Δ — Δ IES nach Chromatographie in Propanol/Ammoniak/Wasser
 o — o IES nach Chromatographie in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser

Abbildung 5
Absorptionsspektren der Indolylessigsäure

gereinigt. Das zur Verfügung stehende Methyläthylketon ließ sich auf diesem Wege nicht ganz frei von Verunreinigungen erhalten. Darauf sind die gelegentlichen Schwankungen der R_f -Werte im Lösungsmittelgemisch Methyläthylketon/Pyridin/Wasser zurückzuführen.

Tabelle 3

R_f -Werte von Indolylessigsäure in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

Zusammensetzung der Lösungsmittelgemische	R_f -Wert
60 Vol.-% n-Propanol, 30 Vol.-% Ammoniak, 10 Vol.-% Wasser	0,82
70 Vol.-% Methyläthylketon, 15 Vol.-% Pyridin, 15 Vol.-% Wasser	0,68
70 Vol.-% wassergesättigtes n-Butanol, 10 Vol.-% Ammoniak, n-Butanol bis zur Klärung des Gemisches	0,36
40 Vol.-% Essigester, 20 Vol.-% Pyridin, 40 Vol.-% Wasser	0,77

3. Auswahl der Lösungsmittelgemische

Bei der Wahl des Lösungsmittelgemisches war darauf zu achten, daß Stoffe, die sich bei den angeführten Nachweisreaktionen ähnlich verhalten wie Indolylessigsäure, von ihr abgetrennt werden konnten. Verbindungen, die auf Grund ihres Vorkommens in Pflanzenextrakten bzw. ihrer ähnlichen biologischen Wirksamkeit am leichtesten mit Indolylessigsäure verwechselt werden könnten, sind Tryptophan, Indolylpropionsäure und Indolylbuttersäure. Es wurden daher die R_f -Werte von Tryptophan und Indolylbuttersäure bestimmt (Indolylpropionsäure stand nicht zur Verfügung).

Tabelle 4
 R_f -Werte von Indolylessigsäure, Tryptophan und Indolylbuttersäure

Lösungsmittelgemisch	R_f -Wert Indolyl- essigsäure	R_f -Wert Tryptophan	R_f -Wert Indolyl- buttersäure
Propanol/Ammoniak/H ₂ O	0.82	0.79	0.88
Methyläthylketon/Pyridin/H ₂ O	0.68	0.54	0.80
Butanol/Ammoniak/H ₂ O	0.36	0.25	0.58
Essigester/Pyridin/H ₂ O	0.77	0.70	0.87

Wie die Tabelle 4 erkennen läßt, ist zur Trennung der drei untersuchten Verbindungen die Anwendung von Methyläthylketon/Pyridin/Wasser am günstigsten; die R_f -Werte liegen relativ weit auseinander.

Bei der Auswahl der Lösungsmittel mußte weiter berücksichtigt werden, daß das Lösungsmittelgemisch die biologischen Tests nicht stört. Das Eluat eines Papierstreifens, durch den ohne Substanz das Gemisch Propanol/Ammoniak/Wasser gelaufen war, zeigte im Kresse-Test keine Wirksamkeit. Ein ebenso mit Methyläthylketon/Pyridin/Wasser behandelter Streifen ergab ein Eluat, das im Kresse-Test eine geringfügige Hemmung bewirkte. Durch Mitführen einer Kontrolle konnte jedoch auch dieses Lösungsmittel verwendet werden.

4. Quantitative Bestimmung der chromatographisch abgetrennten Indolylessigsäure

Nachdem die oben beschriebenen qualitativen Methoden die Eignung der Papierchromatographie zur Trennung und Bestimmung der Indolylessigsäure bewiesen hatten, konnte mit Versuchen zur quantitativen Ausgestaltung des Verfahrens begonnen werden.

Auf dem 8 cm breiten Papierstreifen wurden jeweils 100 bis 300 γ Indolylessigsäure aufgetragen. Nach der Chromatographie erfolgte der Nachweis der Indolylessigsäurezone durch die Zimtaldehydreaktion auf einem 1,5 cm breiten abgeschnittenen Randstreifen. Aus dem restlichen Teil der Zone ließ sich die Säure in der im methodischen Teil (S. 4) angegebenen Weise eluieren. Die Konzentration des Eluates an Indolylessigsäure wurde im Kressewurzel-Test und spektrophotometrisch aus der Extinktion bestimmt. Die Konzentration ergibt sich aus der Extinktion nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c = \frac{1}{\epsilon_m \cdot d} \cdot \log \frac{J_0}{J}$$

$\log \frac{J_0}{J}$ wird im Beckman-Spektrophotometer bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums (280 $m\mu$) gemessen, ϵ_m ist der molare Extinktionskoeffizient der Indolylessigsäure bei 280 $m\mu$. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen zusammengestellt.

Tabelle 5

Konzentrationsbestimmung nach Chromatographie im Lösungsmittelgemisch Propanol/Ammoniak/Wasser

aufgetr. Menge γ	eluert mit ccm Wasser	$\log \frac{J_0}{J}$ gemessen	molare Konzentration	gefundene Menge γ	gefundene Menge + 20% γ
300	7	1.07	$1.87 \cdot 10^{-4}$	230	290
200	3	1.69	$2.96 \cdot 10^{-4}$	156	196
100	4	0.75	$1.31 \cdot 10^{-4}$	92	112

Tabelle 6

Konzentrationsbestimmung nach Chromatographie im Lösungsmittelgemisch Methyläthylketon/Pyridin/Wasser

aufgetr. Menge γ	eluert mit ccm Wasser	$\log \frac{J_0}{J}$ gemessen	molare Konzentration	gefundene Menge γ	gefundene Menge + 20% γ
100	3,7	0.710	$1.24 \cdot 10^{-4}$	80.5	100.5
100	4	0.580	$1.02 \cdot 10^{-4}$	71.5	91.5
100	10	0.278	$4.86 \cdot 10^{-5}$	85	105
150	3,2	1.315	$2.3 \cdot 10^{-4}$	129	159

Die Tabellen zeigen, daß die nach der Chromatographie gefundenen Mengen an Indolylessigsäure um 15—20 % unter den aufgetragenen liegen. Diese Differenz entfällt auf den zum Nach-

weis der Indolylessigsäure abgeschnittenen Streifen. Der Verlust durch den Randstreifen ist bei kleineren Konzentrationen geringer als bei größeren, da die Startlinie auf dem 8 cm breiten Streifen nur 6 cm lang ist und sich bei größeren Konzentrationen die Zone nach den Rändern zu stärker ausbreitet.

Zur Konzentrationsbestimmung im Hemmbe-
reich des Kresse-Testes wurde eine Verdünnungsreihe
des Eluates hergestellt und die Wirkungskurve mit der Standard-
kurve der Indolylessigsäure verglichen. Diejenige Konzentration
des Eluates, die eine 50 %ige Hemmung der Kressewurzel hervor-
rief, entsprach dann derjenigen der reinen Indolylessigsäure, die
die gleiche Wirkung zeigt. Daraus konnte die Ausgangskonzent-
ration des Eluates errechnet werden.

Tabelle 7

Konzentrationsbestimmung im Kresse-Test mit gleichzeitiger Kontrolle im
Beckman-Spektrophotometer nach Chromatographie in Methyläthylketon/
Pyridin/Wasser

aufgetr. Menge γ	eluiert mit ccm Wasser	Kresse-Test			Beckman	
		Ausgangs- konzentr. molar	gefundene Menge γ	gefundene Menge + 20% γ	gefundene Menge γ	gefundene Menge + 20% γ
200	7.5	$9.5 \cdot 10^{-4}$	125	165	140	180
100	4	$1 \cdot 10^{-4}$	70	90	82.7	102.7

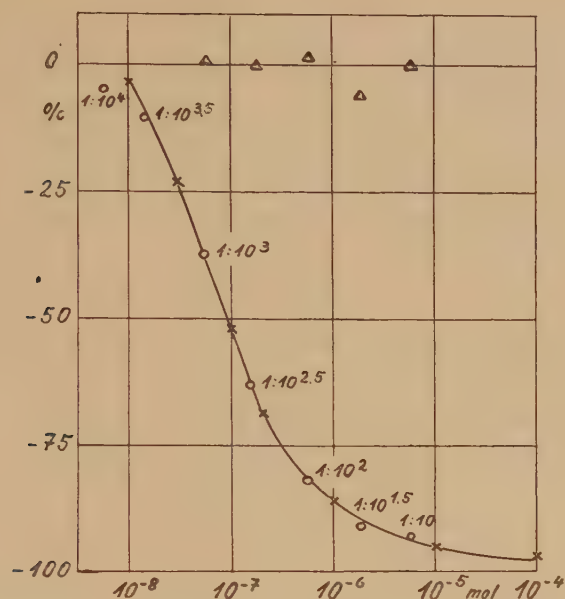
Eine vergleichende Konzentrationsbestimmung im Beckman-Spektrophotometer zeigte, daß die quantitative Bestimmung im Kresse-Test für einen biologischen Test recht gute Ergebnisse liefert.

Daß die Indolylessigsäure auch nach der papierchromato-
graphischen Trennung von Gemischen aus chemisch ähnlichen Sub-
stanzen quantitativ bestimmt werden kann, zeigen die in Tab. 8
angegebenen Versuche. Es wurden 150 γ Indolylessigsäure + 150 γ
Tryptophan in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser chromatographiert
und die beiden getrennten Zonen eluiert.

Tabelle 8

aufgetr. Menge JES γ	eluiert mit ccm Wasser	Kresse-Test			Beckman	
		Ausgangs- konzentr. molar	gefundene Menge γ	gefundene Menge + 20% γ	gefundene Menge γ	gefundene Menge + 20% γ
150	8.3	$5.5 \cdot 10^{-5}$	80	110	88	118
150	6.2	$1.17 \cdot 10^{-4}$	127	157	121	151

Einen Beweis für die vollständige Trennung der beiden Substanzen liefert auch der Erbsen-Test, in dem das Eluat der Tryptophan-Zone keine Wirksamkeit zeigte (Abb. 6). Im Kresse-Test war dieses Eluat in einer Verdünnung von 1 : 10 bis 1 : 1000 ebenfalls unwirksam.



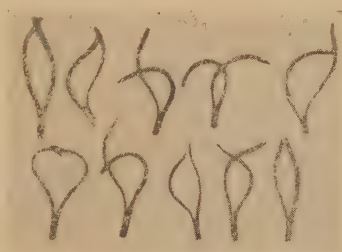
- x — x Indolylessigsäure-Standardkurve
 o — o Indolylessigsäure nach Chromatographie
 Δ — Δ Tryptophan nach Chromatographie

Wirkungskurven im Kresse-Test von Indolylessigsäure und Tryptophan nach Chromatographie in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser.

Wuchsstoffwirkung im Erbsen-Test



Tryptophan



Indolylessigsäure

Abbildung 6

5. Quantitative Bestimmung der papierelektrophoretisch abgetrennten Indolylessigsäure

Da sich für die Abtrennung der Indolylessigsäure aus Pflanzenextrakten neben der Papierchromatographie die zusätzliche Anwendung der Papierelektrophorese als notwendig erwies, wurden die Modellversuche auch auf dieses Gebiet ausgedehnt.

Bei Verwendung von 1/20 mol. Na-Acetat-Puffer ($p_H = 6.8$) und einer Anfangsspannung von 220 V konnte nach 2 Stunden die Zone der Indolylessigsäure in 4,5 cm Entfernung von der Startlinie auf der der Anode zugewandten Seite festgelegt werden. Das Eluat dieser Zone zeigte das Absorptionsspektrum der Indolylessigsäure, aus dem die Konzentration ermittelt wurde.

Tabelle 9

aufgetr. Menge γ	eluiert mit ccm Wasser	$\log \frac{J_0}{J}$ gemessen	molare Konzentration	gefundene Menge γ	gefundene Menge + 20% γ
100	2.7	1.05	$1.84 \cdot 10^{-4}$	87	107

Ebenso wie bei der Papierchromatographie konnte hier unter Berücksichtigung des abgeschnittenen Nachweiststreifens die aufgetragene Menge Indolylessigsäure bestimmt werden.

Bei aufeinanderfolgender Anwendung von Papierchromatographie und -elektrophorese mußte so vorgegangen werden, daß das nach der Chromatographie erhaltene Eluat wieder eingedampft und für die Elektrophorese aufgetragen wurde. Durch die verschiedenen Arbeitsgänge war mit einem Verlust zu rechnen, der bei der quantitativen Auswertung auch festgestellt werden konnte. Je 200 γ Indolylessigsäure wurden auf 2 Streifen zur Chromatographie in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser aufgetragen. Bei Streifen 1 erfolgte die Konzentrationsbestimmung der eluierten Indolylessigsäure durch den Kresse-Test und Aufnahme des Absorptionsspektrums. Das Eluat von Streifen 2 wurde nach der Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer auf 1 ccm eingedampft und zur Elektrophorese aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese und Elution konnten die in Tabelle 10 zusammengestellten Ergebnisse erhalten werden.

Tabelle 10

Streifen	aufgetr. Menge	eluiert mit ccm Wasser	Beckman		Kresse-Test	
	γ		molare Konzentr- tration	gefund. Menge	Ausgangs- konzentr. molar	gefund. Menge γ
1	200	7,5	$1,07 \cdot 10^{-4}$	140	$9,5 \cdot 10^{-5}$	125
2	200	7,8	$1,09 \cdot 10^{-4}$	149	$4 \cdot 10^{-5}$	70
		10	$4,73 \cdot 10^{-5}$	83		

In einem weiteren Versuch kamen die beiden Methoden in umgekehrter Reihenfolge zur Anwendung, indem die Indolylessigsäure zuerst der Elektrophorese und anschließend der Chromatographie unterworfen wurde. Die in Tabelle 11 aufgeführten Ergebnisse zeigen ähnliche Werte.

Tabelle 11

Streifen	aufgetr. Menge	eluiert mit ccm Wasser	Beckman		Kresse-Test	
	γ		molare Konzentr- tration	gefund. Menge γ	Ausgangs- konzentr. molar	gefund. Menge γ
1	200	6.5	$1,17 \cdot 10^{-4}$	133	$1,2 \cdot 10^{-4}$	136
2	200	7.5	$7,7 \cdot 10^{-5}$	102	$8 \cdot 10^{-5}$	77
		5.5	$8,37 \cdot 10^{-5}$	80.5		

II. Orientierende papierchromatographische Bestimmung der Indolylessigsäure in Harn und pflanzlichen Extrakten

I. Bestimmung der Indolylessigsäure in Harn

Von F. KÖGL wurden bei der Aufarbeitung von Harn auf Auxin größere Mengen Indolylessigsäure isoliert (KÖGL, HAAGEN-SMIT und ERXLEBEN 1934). Deshalb schien es günstig, an diesem Material die ersten Versuche zur papierchromatographischen Abtrennung der Indolylessigsäure aus Extrakten vorzunehmen.

Extraktion: 2 Liter Harn wurden auf 130 ccm eingedampft und blieben, mit 130 ccm peroxydfreiem Äther versetzt, über Nacht im Eisschrank stehen. Nach Abtrennen der ätherischen Schicht wurde die wäßrige Lösung noch zweimal mit je 50 ccm Äther ausgeschüttelt. Aus den vereinigten Ätherextrakten konnte nach dem Abdampfen des Äthers durch Verreiben des Rückstandes mit 15 ccm heißem Wasser Indolylessigsäure herausgelöst werden. Mit der Gefriertrocknungsmethode wurde auf 1 ccm eingengt und der so gewonnene Extrakt zur Chromatographie aufgetragen. Als Lösungs-

mittel diente Propanol/Ammoniak/Wasser. Durch die Farbreaktion mit Zimtaldehyd-HCl ließ sich eine Zone festlegen, deren R_f -Wert von 0,82 mit dem der reinen Indolylessigsäure übereinstimmte. Das Eluat dieser Zone ergab im Kresse-Test eine Wirkungskurve, die mit der Standard-Kurve der Indolylessigsäure zur Deckung gebracht werden konnte. Die Wuchsstoffwirkung im Erbsen-Test ließ ebenfalls das Vorliegen von Indolylessigsäure erkennen.

Einer Verbesserung der Extraktionsmethode, die für eine quantitative Bestimmung notwendig gewesen wäre, stand die sehr unterschiedliche Zusammensetzung des zur Verfügung stehenden Harns entgegen. Deshalb beschränkten sich die Versuche darauf, das Vorhandensein von Indolylessigsäure im Harn durch papierchromatographische Abtrennung qualitativ zu bestätigen.

2. Bestimmung der Indolylessigsäure im Mais

Wie aus der Literatur bekannt ist, wurde Indolylessigsäure in den verschiedensten Teilen der Maispflanze festgestellt. Die Identifizierung geschah auf verschiedene Weise, z. B. Prüfung auf Laugfestigkeit und Säureempfindlichkeit, Molekulargewichtsbestimmung (v. GUTTENBERG und LEHLE-JÖRGES 1947), Bestimmung des Schmelzpunktes und Aufnahme des Infrarotabsorptionsspektrums (BERGER und AVERY 1944). So war auch zu erwarten, daß mit Hilfe der hier ausgearbeiteten Methode das Vorkommen von Indolylessigsäure im Mais bestätigt und darüber hinaus eine quantitative Bestimmung ermöglicht würde.

Zur Gewinnung von wuchsstoffhaltigen Pflanzenauszügen sind die verschiedensten Verfahren bekannt. Je nach der angewandten Extraktionsmethode werden unterschiedliche Wuchsstoffmengen erfaßt. Wie verschiedene Autoren berichten (VAN OVERBEEK, OLIVA und DE VAZQUEZ 1945, VAN OVERBEEK, DE VAZQUEZ und GORDON 1947), läßt sich außerdem bei wiederholter Extraktion immer noch Wuchsstoff nachweisen, der entweder aus einer gebundenen Form in Freiheit gesetzt oder aus Vorstufen gebildet wird. Aus diesem Grunde läßt sich der Wuchsstoffgehalt eines Pflanzenorganes kaum quantitativ bestimmen, sondern es kann nur eine Aussage über Gehalt und Art des unter bestimmten Bedingungen gewonnenen Extraktes gemacht werden. Da es für das Ziel der vorliegenden Arbeit nur wichtig war, über größere Wuchsstoffmengen zu verfügen, wurde auf die quantitative Extraktion des untersuchten Materials kein Wert gelegt.

a) Extraktion:

Die Untersuchung verschiedener Extraktionsmethoden zeigte, daß bei der Chromatographie von Pflanzenauszügen der Extraktion eine besondere Sorgfalt zugewendet werden muß. Für die Abtrennung der Indolylessigsäure aus Maisextrakt erwiesen sich Äther-Extraktionen mit vorausgehender Petroläther-Behandlung oder anschließender NaHCO_3 -Ausschüttelung als geeignet.

a) Äther-Extraktion mit vorausgehender Petroläther-Behandlung

Um Fett und ölige Substanzen zu entfernen, wurde feingemahlener Mais⁴ einer 8-stündigen Vorextraktion mit Petroläther (Kp. 30—40°) im Soxhlet unterworfen. Nach kurzem Trocknen folgte eine 8stündige Extraktion mit peroxydfreiem Äther. Der nach Abdampfen des Äthers schwach gelb gefärbte Rückstand wurde mit heißem Wasser zerrieben und die wäßrige Lösung zur Chromatographie aufgetragen.

β) Äther-Extraktion mit anschließender NaHCO_3 -Ausschüttelung

Zu nahezu farblosen Extrakten kam man, wenn der Äther-Extrakt einer Behandlung mit NaHCO_3 -Lösung unterworfen worden war. Dabei erübrigte sich die Vorbehandlung mit Petroläther. Folgende Arbeitsweise bewährte sich: 250 g Maisschrot wurden etwa 8 Stunden mit 500 ccm Äther extrahiert und die auf 200 ccm eingeeengte Lösung 2mal mit je 20 ccm 5 %iger wäßriger NaHCO_3 -Lösung durchgeschüttelt. Nach dem Abtrennen und Ansäuern der wäßrigen Schicht mit 2n-HCl konnte der Wuchsstoff erneut mit 3mal je 30 ccm Äther extrahiert werden. Der nach Eindampfen des Äthers erhaltene Rückstand wurde in wenig heißem Wasser aufgenommen und diese Lösung der Chromatographie unterworfen.

b) Bestimmung von R_f -Werten des Wuchsstoffes im Maisextrakt

Nach der Chromatographie der oben beschriebenen Auszüge ließ sich mit Zimtaldehyd auf dem Papierstreifen eine deutlich rot gefärbte Zone nachweisen. An derselben Stelle konnte bei Untersuchung in den biologischen Testen im Kresse-Test die für Indolylessigsäure charakteristische Wirkungskurve und im Erbsen-Test Wuchsstoffwirkung gefunden werden.

⁴ Hochzucht-Saatgut „Gelber Badischer Landmais“ Ernte 1950 und 1951.

Tabelle 12 zeigt die in verschiedenen Lösungsmittelgemischen bestimmten R_f -Werte des Wuchsstoffes im Maisextrakt. Wegen der Abhängigkeit des R_f -Wertes von der Temperatur und evtl. Verunreinigungen der Lösungsmittel war es zweckmäßig, bei der Chromatographie der Extrakte jeweils unter gleichen Bedingungen ein Chromatogramm der reinen Indolylessigsäure mitlaufen zu lassen. Der Tabelle kann entnommen werden, daß im Chromatogramm des Maisextraktes die R_f -Werte der Wuchsstoffzone recht gut mit denen der Indolylessigsäure übereinstimmen.

Tabelle 12
 R_f -Werte des Wuchsstoffes im Maisextrakt in verschiedenen Lösungsmittelgemischen

Lösungsmittel	Wuchsstoff im Extrakt	Indolylessigsäure
Propanol/Ammoniak/Wasser	0.84	0.81
Methyläthylketon/Pyridin/Wasser	0.63	0.64
Butanol/Ammoniak/Wasser	0.28	0.27

c) Absorptionsspektrum des Wuchsstoffes im Maisextrakt

Das Absorptionsspektrum des abgetrennten Wuchsstoffes wurde nach Elution aus dem Chromatogramm im Beckman-Spektrophotometer aufgenommen. Nach Chromatographie in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser konnte das für die Indolylessigsäure charakteristische Absorptionsspektrum erhalten werden.

Tabelle 13
Absorptionsmaxima und -minima des im Maisextrakt enthaltenen Wuchsstoffes

	Maximum	Minimum
Wuchsstoff im Extrakt	284 $m\mu$	245 $m\mu$
Indolylessigsäure	280 $m\mu$	245 $m\mu$

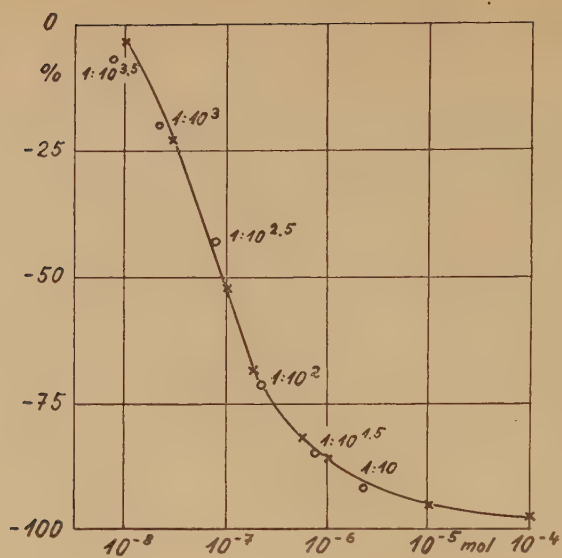
Mit der Übereinstimmung der Absorptionsspektren war ein weiterer Beweis für die Identität des abgetrennten Wuchsstoffes mit Indolylessigsäure gegeben.

d) Quantitative Bestimmung der Indolylessigsäure im Maisextrakt

Versuche, den Wuchsstoffgehalt nach der Chromatographie in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser aus der Extinktion und mit Hilfe des Kresse-Testes quantitativ zu bestimmen, gaben kein übereinstimmendes Ergebnis. Die Intensität der Farbreaktion und die Wuchsstoffwirkung im Erbsen-Test, die durch Vergleich mit Modellversuchen abgeschätzt werden konnten, entsprachen der im Kresse-Test gefundenen Konzentration. Dagegen lag die aus der Extinktion erhaltene Konzentration um etwa 1 Zehnerpotenz höher.

Da zu vermuten war, daß die Indolylessigsäure nach der Chromatographie noch nicht vollständig von ihren Begleitsubstanzen abgetrennt war, wurde das papierchromatographische Verfahren mit der Papierelektrophorese kombiniert. Bei der Abtrennung des Wuchsstoffes aus Mais konnte auch hier wieder bestätigt werden, daß es sich um Indolylessigsäure handelt; der Wuchsstoff wanderte bei $pH = 4,8$ in Richtung auf die Anode und konnte mittels der Zimtaldehydreaktion an der gleichen Stelle gefunden werden wie auf einem Kontrollstreifen die Indolylessigsäure.

Zur quantitativen Auswertung erfolgte die Aufarbeitung von 500 g Mais nach dem Äther- $NaHCO_3$ -Verfahren. Der daraus erhaltene Rückstand wurde zur Chromatographie bzw. Elektrophorese aufgetragen. Die Trennung erfolgte erstens durch Elektrophorese in Na-Acetat-Puffer ($pH = 4,8$). Tabelle 14 zeigt die im Eluat der Wuchsstoffzone aus dem Extinktionskoeffizienten und der Wirksamkeit im Kresse-Test bestimmten Konzentrationen. Die Wirkungskurve im Kresse-Test und die Wuchsstoffwirkung im Erbsen-Test sind in Abbildung 7 dargestellt. Weiter kam die für reine Indolylessigsäure beschriebene Kombination von Chromatographie in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser und Elektrophorese bei $pH = 4,8$ zur Anwendung. Die Konzentrationen, die nach der Elektrophorese im Eluat der Wuchsstoffzone aus der Extinktion und dem Kresse-Test gefunden werden konnten, sind ebenfalls in Tabelle 14 zusammengestellt. Es ist ersichtlich, daß selbst bei kombinierter Anordnung der beiden Trennungsvorgängen die Werte aus dem biologischen Test und der Extinktionsmessung nicht übereinstimmen. Auch hier deuteten die Intensität der Farbreaktionen und die Wirksamkeit im Erbsen-Test auf die Richtigkeit des im Kresse-Test erhaltenen Resultates hin.



x — x Indolylessigsäure-Standardkurve
 o — o Wirkungskurve des Maiswuchsstoffes

Wirkungskurve des Maiswuchsstoffes im Kresse-Test nach Elektrophorese.



Wirkung des Maiswuchsstoffes im Erbsen-Test

Abbildung 7

Tabelle 14

Konzentrationsbestimmung nach Elektrophorese und kombinierter Anwendung von Papierchromatographie und Elektrophorese

	Beckman			Kresse-Test		Absorptions- spektrum	
	eluiert mit ccm Wasser	molare Konzentration	gefund. Menge γ	Ausgg.- konzentr. molar	gefund. Menge γ	Maxi- mum m μ	Mini- mum m μ
1. Elektro- phorese	3,5	$1,47 \cdot 10^{-3}$	900	$2,5 \cdot 10^{-5}$	15	285	240
2. Chromato- graphie + Elektro- phorese	10	$3,22 \cdot 10^{-4}$	585	$5 \cdot 10^{-6}$	9	280	242

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß der mit Hilfe der Papierchromatographie und Papierelektrophorese aus Maisextrakt abgetrennte Wuchsstoff auf Grund der verschiedensten qualitativen Beweise wohl als Indolylessigsäure angesprochen werden kann. Die Abweichungen bei der quantitativen Bestimmung, die durch weitere Untersuchungen aufgeklärt werden sollen, lassen aber erkennen, daß eine Nachweismethode allein keine eindeutige quantitative Aussage zuläßt.

e) Bestimmung der Indolylessigsäure in Orchideenpollinien

Um an einem weiteren Beispiel die Anwendbarkeit der Papierchromatographie zur Bestimmung der Indolylessigsäure in Pflanzenextrakten zu prüfen, wurden Orchideen-Pollinien zur Untersuchung herangezogen.

Die Pollinien tropischer Orchideen stellen ein Objekt dar, das für die Wuchsstoff-Forschung von größter Bedeutung ist. In ihnen entdeckte H. FITTING schon 1909 einen Stoff, dessen physiologische Wirkung der der Wuchsstoffe sehr ähnlich ist. Da von dem Pollen-hormon hinsichtlich seiner chemischen Natur nur die Löslichkeits-eigenschaften festgestellt waren, griffen LAIBACH und MASCHMANN (1932, 1933) nach dem Bekanntwerden von Wuchsstoff in Avena-Koleoptilen, in der Kulturflüssigkeit von *Rhizopus suinus* und der Entdeckung von Auxin im Harn diese Untersuchung wieder auf. Sie stellten fest, daß der Extrakt aus Orchideen-Pollinien das Streckungs-wachstum in der gleichen Weise förderte wie der in Extrakten aus *Rhizopus suinus* aufgefundene Wuchsstoff. Diese Eigenschaft, sowie die Löslichkeitsverhältnisse, H_2O_2 -Empfindlichkeit, Thermostabilität

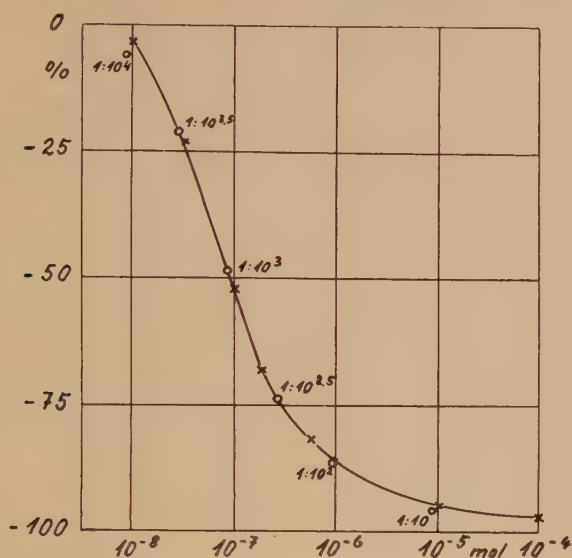
ließen auf eine Identität mit Indolylessigsäure schließen. Da es sehr schwierig ist, größere Mengen an Orchideen-Pollinien zu erhalten, die für die Reindarstellung der wirksamen Substanz notwendig wären, schien die hier ausgearbeitete Methode geeignet, an kleinen Mengen eine genauere Aussage über die chemische Natur des Wuchsstoffes zu machen.

Extraktion: 900 mg Pollinien verschiedener Orchideenarten, die während eines halben Jahres gesammelt und im Eisschrank aufbewahrt wurden, kamen zur Aufarbeitung. Zur Vorreinigung des fein zerriebenen Materials erfolgte eine 2-stündige Extraktion mit 200 ccm Petroläther (Kp. 30—40°) im Soxhlet-Apparat. Nach kurzem Trocknen schloß sich eine 4-stündige Extraktion mit 200 ccm peroxydfreiem Äther an. Der nach Abdampfen des Äthers gewonnene Rückstand konnte mit heißem Wasser zerrieben und zur Chromatographie aufgetragen werden.

Die Trennung erfolgte zunächst in dem Lösungsmittelgemisch Butanol/Ammoniak/Wasser. Auf dem entwickelten Chromatogramm ließ die Farbreaktion eine deutlich gefärbte rote Zone mit dem R_f -Wert 0,39 erkennen. Der R_f -Wert einer gleichzeitig mitgelaufenen Indolylessigsäure-Kontrolle betrug ebenfalls 0,39. Das Absorptionsspektrum der in dem Eluat dieser Zone vorliegenden Substanz zeigte ein Minimum bei 242 $m\mu$, das mit dem der Indolylessigsäure übereinstimmte, während das Maximum bei 270 $m\mu$ gegenüber dem der Indolylessigsäure um 10 $m\mu$ zu tief lag. Bei einer weiteren Chromatographie in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser wanderte der Wuchsstoff mit dem R_f -Wert 0,64, derjenige der reinen Indolylessigsäure war ebenfalls 0,64. Das im Eluat gemessene Absorptionsspektrum hatte sich gegenüber dem oben erhaltenen nicht verändert. Das Maximum lag bei 268 $m\mu$, das Minimum bei 242 $m\mu$. Im Kresse-Test konnte durch Verdünnung des Eluates eine Wirkungskurve erhalten werden, die sich gut mit der der Indolylessigsäure zur Deckung bringen ließ (Abb. 8). Die hieraus bestimmte Konzentration an Indolylessigsäure betrug in 3 ccm Eluat etwa $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l = 53 γ . Die im Erbsen-Test gefundene Wuchsstoffwirkung und die Intensität der Farbreaktion lagen ebenfalls in dieser Größenordnung.

Bei einem weiteren Versuch wurde der Chromatographie in Methyläthylketon/Pyridin/Wasser eine Trennung durch Elektrophorese bei $pH = 4,8$ angeschlossen. Hier wanderte der Wuchsstoff mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Indolylessigsäure nach der

der Anode zugewandten Seite und konnte mit der Zimtaldehydreaktion nachgewiesen werden. Das Absorptionsspektrum des Eluates dieser Zone zeigte ein Minimum bei $242\text{ m}\mu$, das Maximum lag wieder bei $270\text{ m}\mu$.



○ — ○ Wirkungskurve des Pollinien-Wuchsstoffes

x — x Indolylessigsäure-Standardkurve

Wirkungskurve des Pollinien-Wuchsstoffes im Kresse-Test.



Wirkung des Pollinien-Wuchsstoffes im Erbsen-Test.

Abbildung 8

Die sich aus dem Vergleich der Absorptionsspektren ergeben den Abweichungen lassen die Möglichkeit offen, daß die Indolylessigsäure noch von verunreinigenden Substanzen begleitet wird oder daß es sich gar nicht um Indolylessigsäure, sondern um eine ihr sehr ähnliche Verbindung handelt. Diese Frage soll ebenfalls Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Zusammenfassung

1. Indolylessigsäure läßt sich in schwach basischen Lösungsmittelgemischen wie Propanol/Ammoniak/Wasser, Methyläthylketon/Pyridin/Wasser, Butanol/Ammoniak/Wasser auf Papier chromatographieren und auf dem Streifen durch folgende Methoden nachweisen:
 - a) Farbreaktion mit Zimtaldehyd + HCL,
 - b) Austestung des in einzelne Zonen geschnittenen Streifens im Kresse-Test und Erbsen-Test.
 - c) Bestrahlen des Streifens mit Licht der Wellenlängen 270 bis 290 m μ und photographische Abbildung auf unterlegtem Photopapier (Photoprintverfahren).
2. Zur quantitativen Bestimmung der chromatographierten Indolylessigsäure mittels biologischer Teste erweist sich der Kresse-Test im Hemmbereich als sehr geeignet. Hier sind die Werte jederzeit reproduzierbar; unbekannte Konzentrationen an Indolylessigsäure lassen sich durch Vergleich mit einer Standardkurve feststellen.
3. Modellversuche zur quantitativen Bestimmung der Indolylessigsäure nach der Chromatographie ergeben, daß diese zu 90—95 % aus dem Streifen wiedergewonnen werden kann. Gleichzeitige Konzentrationsbestimmungen im Kresse-Test und aus der im Beckman-Spektrophotometer am Maximum der Absorptionskurve gemessenen Extinktion zeigen gute Übereinstimmung.
4. Die Abtrennung der Indolylessigsäure aus Harn wird nach der ausgearbeiteten Methode durchgeführt. Man erhält nach der Chromatographie des Ätherextraktes eine Substanz, die den R_f-Wert der Indolylessigsäure besitzt, die Farbreaktion mit Zimtaldehyd ergibt und im Kresse- und Erbsen-Test die Wirkung der Indolylessigsäure zeigt.
5. Die Chromatographie des durch Ätherextraktion mit anschließender Natriumbicarbonat-Ausschüttelung gewonnenen Maisextraktes liefert einen Wuchsstoff, der in verschiedenen Lösungsmittelgemischen jeweils mit der gleichen Geschwindigkeit wie Indolylessigsäure wandert und mit der Zimtaldehydreaktion nachgewiesen werden kann. Auch bei der Papierelektrophorese stimmen Wanderungssinn und Wanderungsgeschwindigkeit mit denen der Indolylessigsäure überein. Die

Wirkung im Kresse- und Erbsen-Test entspricht ebenfalls der dieses Wuchsstoffes. Das im Beckman-Spektrophotometer aufgenommene Absorptionsspektrum zeigt den für Indolylessigsäure charakteristischen Verlauf mit einem Minimum bei $245\text{ m}\mu$ und einem Maximum bei $280\text{--}285\text{ m}\mu$.

6. Die quantitative Bestimmung ergibt eine Wuchsstoffkonzentration, die nach den Ergebnissen im Kresse-Test, Erbsen-Test und der Farbreaktion größenordnungsmäßig übereinstimmt ($0,1\text{ }\gamma/\text{g}$ Mais). Eine von dieser Wuchsstoffmenge bei der quantitativen Auswertung des Absorptionsspektrums erhaltene Abweichung soll in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.
7. Aus Orchideen-Pollinien kann ein Wuchsstoff isoliert werden, der sich bei der Papierchromatographie und Papierelektrophorese sowie den biologischen und chemischen Nachweismethoden ebenso verhält wie Indolylessigsäure. Bezogen auf Indolylessigsäure ergibt die quantitative Bestimmung im Kresse-Test, Erbsen-Test und bei der Farbreaktion angenähert übereinstimmend einen Wert von etwa $100\text{ }\gamma/\text{g}$ Pollinien. Das UV-Absorptionsspektrum dieses Wuchsstoffes zeigt aber ein um $10\text{ m}\mu$ nach kürzeren Wellenlängen verschobenes Maximum. Der Grund hierfür konnte bisher noch nicht aufgefunden werden.

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und für das rege Interesse an meiner Arbeit spreche ich Herrn Professor Dr. Richard Kuhn meinen Dank aus. Den Herren Professor Dr. Friedrich Laibach und Professor Dr. Dietrich Jerchel danke ich für zahlreiche wertvolle Anregungen während der Arbeit.

Literaturzusammenstellung

- AVERY, G. S., BERGER, J., und SHALUCHA, B., *Am. J. Bot.* 28, 596 (1941). — BERGER, J., und AVERY, G. S., *Am. J. Bot.* 31, 199 (1944). — CLAUSS, H., *Z. Naturforsch.* 7b, 112 (1952). — CONSDEN, R., GORDON, A. H., und MARTIN, A. I. P., *Biochem. J.* 38, 224 (1944). — CRAMER, F., *Papierchromatographie*, Weinheim 1952. — DENT, C. E., STEPKA, W., und STEWART, F. C., *Nature* 160, 682 (1947). — FITTING, H., *Z. f. Bot.* 1, 1 (1909). — FUNKE, H., *Jahrbuch wiss. Bot.* 91, 54 (1943). — FUNKE, H., und SÖDING, H., *Forschung u. Fortschr.* 21/23, 220 (1947), *Planta* 36, 341 (1948). — GORDON, S. A., und SANCHEZ-NIEVA, F., *Arch. Biochem.* 20, 356 (1949a), *Arch. Biochem.* 20, 367 (1949b). — V. GUTTENBERG, H., und LEHLE-JOERGES, E., *Planta* 35, 281 (1947). — HAAGEN-SMIT, A. I., LEECH, W. D., und BERGREN, W. R., *Am. J. Bot.* 29, 500 (1942). — HATCHER, E. S. I., *Nature (London)* 151, 278 (1943). — HOLLEY, R. W., BOYLE, F. P., DUFFEE, H. K., und HOLLEY, A. D., *Arch. Biochem.* 32, 192 (1951).

- JACOBS, W., Diplomarbeit, Mainz 1953. — JONES, E. R. H., HENBEST, H. B., SMITH, G. F., und BENTLEY, J. A., *Nature* (London) 169, 485 (1952). — KÖGL, F., HAAGEN-SMIT, A. J., und ERXLEBEN, H., *Z. physiol. Chem.* 228, 90 (1934). — LAIBACH, F., *Ber. dtsch. bot. Ges.* 50, 383 (1932). — LAIBACH, F., und MASCHMANN, E., *Jahrb. wiss. Bot.* 78, 399 (1933). — LARSEN, P., *Dansk botan. Arkiv* 11, 1 (1944); zit. n. P. Larsen, *Annual Rev. Plant Physiol.* 2, 169 (1951), *Nature London* 159, 842 (1947), *Am. J. Bot.* 36, 32 (1949), *Plant Physiol.* 26, 697 (1951). — LINSE, H., *Planta* 31, 32 (1940), *Planta* 39, 377 (1951). — MARKHAM, R., und SMITH, J. D., *Biochem. J.* 45, 294 (1949). — MOEWUS, F., *Z. Naturforsch.* 3b, 135 (1948a), *Planta* 37, 413 (1949a), *Naturwiss.* 35, 124 (1948b), *Biol. Zbl.* 68, 58 (1949b), *Biol. Zbl.* 68, 118 (1949c). — VAN OVERBEEK, J., und WENT, F. W., *Bot. Gaz.* 99 (1937). — VAN OVERBEEK, J., OLIVA, G., und DE VAZQUEZ, E. S., *Bot. Gaz.* 106, 440 (1945). — VAN OVERBEEK, J., DE VAZQUEZ, E. S., und GORDON, S. A., *Am. J. Bot.* 34, 266 (1947). — PÄTAU, K., *Biol. Zbl.* 63, 152 (1943). — REINERT, I., *Z. Naturforsch.* 5b, 374 (1950). — SKOOG, F., THIMANN, K. v., *Science* (N. Y.) 92, 64 (1940). — TANG, Y. W., und BONNER, J., *Arch. Biochem.* 13, 11 (1947). — WIELAND, TH., *Ann. Chem.* 564, 152 (1949). — WIELAND, TH., und FISCHER, E., *Naturwiss.* 35, 29 (1948). — WIELAND, TH., FISCHER, E., und MOEWUS, F., *Ann. Chem.* 561, 47 (1949). — WILDMAN, S. G., und BONNER, J., *Arch. Biochem.* 14, 381 (1947), *Am. J. Bot.* 35, 740 (1948).

Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und für das rege Interesse an meiner Arbeit spreche ich Herrn Professor Dr. Richard Kuhn meinen Dank aus. Herrn Dr. Franz Moewus danke ich für die Stellung des Themas und den Herren Professor Dr. Friedrich Laibach und Professor Dr. Dietrich Jerchel für zahlreiche wertvolle Anregungen während der Arbeit.

Lebenslauf

Ich wurde am 16. Mai 1924 als Tochter des Kaufmannes Friedrich Eugen Müller und dessen Ehefrau Marie geb. Baacke in Eberbach/Neckar geboren. Von 1930 bis 1935 besuchte ich die Volksschule in Eberbach, anschließend trat ich in die Hohenstaufenschule, Oberschule für Jungen, in Eberbach ein. Nach bestandener Reifeprüfung im Frühjahr 1943 erfüllte ich meine einjährige Arbeitsdienstpflicht und begann im Frühjahr 1944 mit dem Studium in der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Heidelberg. Im Herbst 1944 wurde ich zu der Firma Stotz-Apparatebau in Eberbach kriegsdienstverpflichtet und konnte erst im Frühjahr 1946 das Studium an der Universität Heidelberg fortsetzen. Im Mai 1950 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen in den Fächern Biologie, Chemie und Physik. Seit November desselben Jahres führte ich am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, meine Dr.-Arbeit durch.